CheKine™ β-淀粉酶活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1380　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**0.0156-1 mg/mL		**灵敏度：**0.0078 mg/mL
	适用样本：血清（浆）、唾液、动植物组织		
	保质期：4℃，避光保存 12 个月		

01 背景与原理

淀粉酶负责水解淀粉，主要包括α-淀粉酶（α-amylase，α-AL）和β-淀粉酶（β-Amylase，β-AL）（EC 3.2.1.2）。β-淀粉酶从淀粉的非还原端切开α-1,4 糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖。

本试剂盒检测原理是淀粉酶催化淀粉水解生成还原糖，还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质，在 540 nm 有吸收峰；通过测定 540 nm 吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。α-淀粉酶耐热，但是β-淀粉酶在 70℃下 15 min 可钝化。因此粗酶液经过 70℃钝化 15 min，就只有α-淀粉酶能够催化淀粉水解。用不钝化的粗酶液测出总淀粉酶活性，减去α-淀粉酶就可得到β-淀粉酶活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
DNS Reagent	40 mL	80 mL	4℃，避光保存
Substrate	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 540 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、制冰机、恒温箱、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
DNS Reagent	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；**DNS Reagent 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验**
Working Substrate	临用前配制；临用前 96 T 加入 42 mL 去离子水，48 T 加入 21 mL 去离子水，上下颠倒摇晃几次，95℃加热至溶解	未用完的试剂可 4℃保存一周，若有沉淀析出，可 95℃加热溶解后使用
10 mg/mL Standard	临用前配制；含 10 mg 无水葡萄糖，临用前加入 1 mL 去离子水溶解得 10 mg/mL 标准品	未用完的试剂可 4℃保存 2 周

05-1-2 标准品配制

按下表所示，用去离子水将 10 mg/mL 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mg/mL 的标准溶液。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品体积	去离子水体积（μL）	标准品浓度（mg/mL）
1	40 μL 10 mg/mL	360	1
2	200 μL of 1 mg/mL	200	0.5
3	200 μL of 0.5 mg/mL	200	0.25
4	200 μL of 0.25 mg/mL	200	0.125
5	200 μL of 0.125 mg/mL	200	0.0625
6	200 μL of 0.0625 mg/mL	200	0.0313
7	200 μL of 0.0313 mg/mL	200	0.0156
空白	0	400	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水匀浆，将匀浆倒入离心管中，在室温下放置 15 min，每隔 5 min 振荡 1 次，使其充分提取。6000 g，室温离心 10 min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1 mL，加入 4 mL 去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α + β)淀粉酶总活力的测定。
- **植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 去离子水捣碎，超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），在室温下放置 15 min，每隔 5 min 振荡 1 次，使其充分提取。6000 g，室温离心 10 min，吸取上清液并且加去离子水定容至 10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1 mL，加入 4 mL 去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α + β)淀粉酶总活力的测定。
- **血清（浆）和唾液等液体样本**：直接测定，建议预实验确定合适的稀释倍数，适当稀释的液体样本即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液 1 mL，加入 4 mL 去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α + β)淀粉酶总活力的测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 540 nm。
2. 水浴锅预热到 70℃。
3. 每个样本取 2 支 EP 管分别加入 75 μL 淀粉酶原液和淀粉酶稀释液，沸水浴 5 min，分别作为α-淀粉酶对照管和总淀粉酶对照管使用。
4. **检测体系配制**：每个样本需分别设置α-淀粉酶活力测定对照和总淀粉酶活力测定对照，空白管只需做 1 管。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：

试剂	标准曲线的测定		α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定	
	标准管（μL）	空白管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）
Standard	75	0	0	0	0	0
去离子水	0	75	0	0	0	0
淀粉酶原液	0	0	75	75（煮沸原液）	0	0
70℃水浴 15 min，冷却						
淀粉酶稀释液	0	0	0	0	75	75（煮沸稀释液）
Working Substrate	0	0	75	0	75	0
40℃恒温水浴中保温 5 min						
DNS Reagent	150	150	150	150	150	150
Working Substrate	75	75	0	75	0	75

5. **吸光度检测：**混匀，沸水浴 5 min，冷却，取 200 μL 至 96 孔板中，测定 540 nm 处吸光度，分别记为 $A_{测定α}$，$A_{对照α}$，$A_{测定总}$，$A_{对照总}$，$A_{标准}$和 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{α}=A_{测定α}-A_{对照α}$，$\Delta A_{总}=A_{测定总}-A_{对照总}$，$\Delta A_{β}=A_{测定总}-A_{α}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$

2. 标准曲线绘制

以标准液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{α}$带入方程得到 y_1 值（mg/mL），$\Delta A_{总}$带入方程得到 y_2 值（mg/mL）。

3. 样本α-淀粉酶活性计算

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/mg prot)=$y_1 \times V_{样} \div (Cpr \times V_{样}) \div T$**=0.2×$y_1$÷Cpr**

- 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/g)=$y_1 \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$**=2×$y_1$÷W**

- 按样本体积计算：

单位的定义：每 L 液体样本每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(U/L)=$1000 \times y_1 \div T$**=200×y_1**

4. 样本总淀粉酶活性计算

- 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

总淀粉酶活性(U/mg prot)=$5 \times y_2 \times V_{样} \div (V_{样} \times Cpr) \div T$**=$y_2$÷Cpr**

- 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟催化产生 1mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

总淀粉酶活性(U/g)=$5 \times y_2 \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$**=10×$y_2$÷W**

- 按样本体积计算：

单位的定义：每 L 液体样本每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

总淀粉酶活性(U/L)=$5 \times 1000 \times y_2 \div T$**=1000×$y_2$**

5. 样本β-淀粉酶活性计算

- 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(U/mg prot)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=$(y_2 \div Cpr) - (0.2 \times y_1 \div Cpr)$**=($y_2$-0.2×$y_1$)÷Cpr**

- 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(U/g)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=$(10 \times y_2 \div W) - (2 \times y_1 \div W)$**=(10×$y_2$-2×$y_1$)÷W**

- 按样本体积计算：

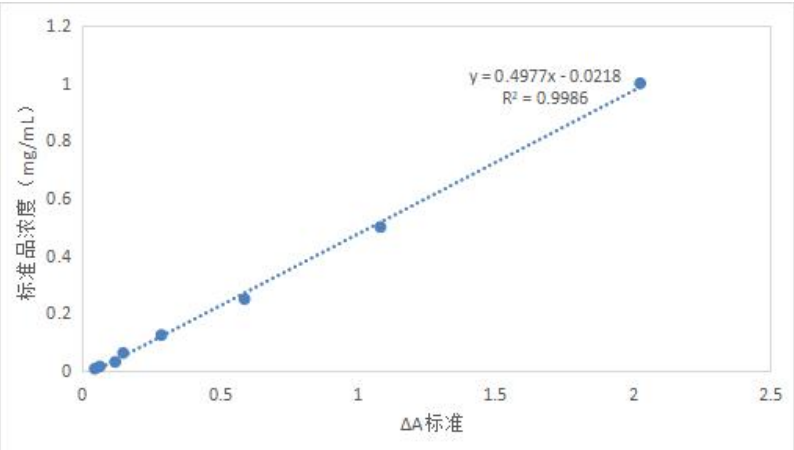
单位的定义：每 L 液体样本每分钟产生 1 mg 还原糖定义为 1 个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(U/L)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性=$(1000 \times y_2) - (200 \times y_1)$**=(1000×$y_2$-200×$y_1$)**

$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.075 mL；W：样本质量，g；$V_{样总}$：样本总体积，10 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；1000：1 L=1000 mL；5：总淀粉酶稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线：y=0.4977x-0.0218，R^2=0.9986



示例-1：取 0.075 mL 小鼠血清，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{\alpha}=A_{测定\alpha}-A_{对照\alpha}=1.484-1.418=0.066$，代入标准曲线，计算 $y_1=0.011$，$\Delta A_{总}=A_{测定总}-A_{对照总}=2-0.573=1.427$，代入标准曲线，计算 $y_2=0.688$。按样本体积计算得：α-淀粉酶活性(U/L)=$200\times y_1$=2.2 U/L，总淀粉酶活性(U/L)=$1000\times y_2$=688 U/L，β-淀粉酶活性(U/L)=$(1000\times y_2-200\times y_1)$=685.8 U/L。

08 FAQ

- **检测得到的样本吸光值过高或者过低怎么办?**

如果样本吸光值大于 1 mg/mL 的$\Delta A_{标准}$值，则说明样本酶活力太高，必须用去离子水进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。若样本吸光值小于 0.005 可以重新提取样本减少去离子水定容的体积。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1300	CheKine™ 葡萄糖检测试剂盒（微量法）
KTB1310	CheKine™ 葡萄糖氧化酶活性（GOD）检测试剂盒（微量法）
KTB1320	CheKine™ 植物可溶性糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1330	CheKine™ 血糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1340	CheKine™ 糖原含量检测试剂盒（微量法）
KTB1350	CheKine™ 总糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1360	CheKine™ 还原糖含量检测试剂盒（微量法）
KTB1370	CheKine™ α-淀粉酶活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ β-淀粉酶活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1380）

样本处理



根据实际需求对样本稀释或不稀释，即为淀粉酶原液



1 mL去离子水匀浆，匀浆液倒入离心管中，在室温下放置15 min，每隔5 min振荡1次



1 mL去离子水捣碎，超声波破碎5 min（功率20%，超声3 s，间隔7 s，重复30次），在室温下放置15 min，每隔5 min振荡1次



6000 g，室温离心10 min，取上清



吸取上述淀粉酶原液1 mL，加入4 mL去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α＋β)淀粉酶总活力的测定。



吸取上清液并且加去离子水定容至10 mL，摇匀，即为淀粉酶原液



吸取上述淀粉酶原液1 mL，加入4 mL去离子水，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于(α＋β)淀粉酶总活力的测定。

体系配置

标准曲线的测定	α-淀粉酶活力测定		总淀粉酶活力测定	
标准品配制				
标准管	空白管	对照管	测定管	对照管	测定管
Standard 75 μL	去离子水 75 μL	淀粉酶原液（煮沸）75 μL	淀粉酶原液 75 μL		

70℃水浴15 min，冷却

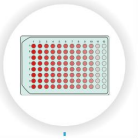
α淀粉酶的测定管加入 Working Substrate 75 μL
总淀粉酶的对照管加入淀粉酶稀释液（煮沸） 75 μL
总淀粉酶的测定管分别加入淀粉酶稀释液 75 μL与Working Substrate 75 μL

40℃恒温水浴中保温5 min

除所有测定管外其他管均加入Working Substrate 75 μL
所有管均加入DNS Reagent 150 μL

混匀，沸水浴5 min，取200 μL至96孔板中

数据检测



测定540 nm吸光度
结果计算

V1.0